

Nagy teljesítőképességű *Rhizobium phaseoli* törzsek izolálásának módszerei

S. A. Z., MAHMOUD, S. M. TAHA és S. H. SALEM

*Ain Sham Egyetem Agronómiai Karának
Mezőgazdasági Mikrobiológiai Tanszéke, Kairo, EAK*

Egyiptom egyes vidékein termesztett bab (*Phaseolus vulgaris*) gyökerein a kutatók nem állapítottak meg effektív gumóképzést még olyan esetekben sem, amikor a magvakat előzőleg specifikus rhizobium törzsszel oltották be. Ilyen adatokat találunk EL-FADL és munkatársai [11, 12] közleményeiben. TAHA [24] a gyökérgumók hiányát elsősorban a termékeny és folyamatosan művelt talajokban állapította meg. A fentiekből olyan következtetéshez jutottak, hogy a *Rhizobium phaseoli* valamilyen káros tényező hatásának van kitéve az említett egyiptomi talajokban.

A bab és más hüvelyesek gyökérgumó képződésének elmaradására vonatkozóan más országokban is végeztek megfigyeléseket. BURTON és munkatársai [8] szerint az USA néhány középnyugati talajában nem fordulnak elő a bab gyökérgumó baktériumai. KAMATA [18] bizonyos szójabab fajták gumóképződésének elmaradását a gyökér alacsony foszfortartalmával magyarázza. TAHA [24] véleménye szerint a gízai Mezőgazdasági Főiskola kísérleti farmján 20 éve monokultúrában termesztett here növényeknél a gumóképzés hiánya a rhizobium fágok károsító hatásának a következménye.

Vannak olyan nézetek is, hogy a különböző talajmikrobák által képzett gátló anyagok csökkentik a rhizobiumok számát a talajban. Így CASAS-CAMPILLO [9] valamint ABD EL-GHAFFAR és ALLEN [1] szerint a sugárgombák gátolják meg *Rhizobium japonicum* és a *Rh. lupini* fajokhoz tartozó gyökérgumó baktériumokat a talajban. VIRTANEN és LINKOLA [29] valamint NILSON [22] arra mutatnak rá, hogy a borsó a here és a bab gyökérzetén a *Bac. mesentericus* által termelt antibiotikus anyagok gátolják a gumóképzést.

WILSON [31] CUNNINGHAM [10], BALDWIN és FRED [7] valamint THORNTON [25] már a 30-as években rámutattak arra, hogy a pillangósok gyökérzetén gumókat képező rhizobiumok teljesítőképességük szempontjából lényegesen eltérnek egymástól. Olyan következtetéshez jutottak, hogy a gumók típusa és elhelyezkedése a gyökéren korrelációban van az alkalmazott törzsek teljesítőképességével.

A gumók száma és mérete, valamint azok teljesítőképessége közötti összefüggést számos kutató LÖHNIS [21], LEONARD [20], FRED, BALDWIN és MCCOY [16], ALLEN és ALLEN [4] WAKSMAN [30], FEDOROV és NITA [15] valamint ALEXANDER [3] vizsgálta. Megállapították, hogy az effektív törzsek által képzett gumók méreteiket tekintve nagyok, megnyúltak, számban korlátozottak és a főgyökérhez közel helyezkednek el.

Újabb tanulmányok a gumóban pigmentek jelenlétét és funkcióját mint a nitrogénkötés nélkülözhetetlen feltételeit hangsúlyozzák. VIRTANEN és mun-

katársai [27], pozitív korrelációt találtak a nitrogénkötés mértéke valamint a gumó leghemoglobin koncentrációja között számos hüvelyes növénynél. Hasonló következtetésekhez jutottak ALLEN és ALLEN [4, 5] valamint ALEXANDER [3] és KAMATA [18] is.

A nagy teljesítőképességű baktériumokat tartalmazó gumók belseje általában rózsaszínű vagy vöröses, méreteiket tekintve nagyok s a főgyökér felső részein és az elsődleges oldalgyökereken helyezkednek el. Feladatunkat annak tanulmányozása képezte, hogy miért nem képződnek effektív gumók a bab gyökérzetén.

Kísérleti rész

Munkánk célkitűzését annak tanulmányozása képezte, hogy vajon az inaktív rhizobium törzsek jelenléte a fágfertőzés vagy a rhizobiumok számára kedvezőtlen talajviszonyok okozzák-e az oltás sikertelenségét. E célból a Mezőgazdasági Minisztérium Mikrobiológiai Osztályától kapott *Rhizobium phaseoli* törzzsel oltottuk be a bab magvakat és különböző talajokba vetettük el azokat. A kifejlődött növényeken nem találtunk effektív baktériumokat tartalmazó gumókat. Ezt követően a bab magvakat homokkultúrában vetettük el amelyet közismerten babtermő vidékekről származó talajokkal oltottunk be. A kifejlődött növények némelyikének gyökérzetén kis számban effektív gumókat találtunk. E gumókból rhizobiumokat tenyésztettünk ki s az így nyert tenyészetekkel oltottuk be a bab magvakat és elvetettük azokat steril homokkultúrákba. Az így nevelt növények gyökérzetén effektív vörös színű gumók képződtek. Ezekből táptalajra vittük át a baktériumokat, majd többszörös magoltás után ismételten kitenyésztettük azokat, hogy ezáltal fokozzuk teljesítőképességüket. Végül is a *Rhizobium phaseoli* 4 törzsét különítettük el, amelyeket a képződött gumóalak, s annak a főgyökéren való elhelyezkedése, mérete, valamint pigmentációja alapján választottunk ki és a teljesítőképesség megállapítása céljából talajt valamint homokot tartalmazó tenyészedenyekben teszteltük a gazdanövény gyökérzetén steril és nem steril feltételek között. A steril körülmények kizárták a bakteriofágok valamint az antagonista talajmikroflora negatív hatásának lehetőségét. A tenyészedenyék-kísérletekhez felhasznált agyagos vályog talaj az Ain Sham Egyetem Mezőgazdasági Karának Shonora El-Khaima-ban levő farmjáról származott. Elővetemény gyapot volt.

A steril növénykultúráknál a bab magvak felületét oltás előtt ALLEN [6] módszere szerint sterilizáltuk. A fertőtlenített magvakat vetés előtt 3 napon át Petri-csészében agarlemezen tartottuk a sterilitás ellenőrzése céljából. A rhizobiumos oltást ugyancsak ALLEN [6] módszere alapján végeztük. Vetésre előzőleg csíráztatott magvakat használtunk fel, amelyeket steril körülmények között vetettünk el a steril homokba, illetve talajba. 45 napos tenyészidő után a növényeket óvatosan kiemeltük a tenyészedenyekből s gyenge vízszugárral eltávolítottuk a gyökerekre tapadt homokot illetve talajt. A gumókat edényenként megszámláltuk és átlagoltuk, majd ezután méret, szín és a gyökérrendszeren való elhelyezkedésük szerint osztályoztuk. A föld feletti részt, a gyökérzetet és a gumókat edényenként elkülönítettük, nyers és száraz állapotban megmértük súlyukat. A kiszáritott növényi részeket ezután porrá törtük és módosított Kjeldahl módszerrel meghatároztuk azok össznitrogén tartalmát. Az így kapott értékek szolgáltak a törzsek teljesítményének kritériumaként.

A kifejlődött növények fő és mellékgyökerein számos effektív gumót találtunk. A négy törzs által képzett gumók morfológiai szempontból is lényegesen eltértek egymástól. Az R_{B_4} -es törzs nagy vörös, ovális tenyéralakú gumókat képzett elsősorban a főgyökéren. Az R_{B_6} -os törzs közepes méretű, gömbalakú, barna színű, a fő és mellékgyökereken egyaránt előforduló gumókat hozott létre. Az R_{B_7} -es törzs által képzett gumók nagyméretűek, gömbalakúak voltak, színük vörös volt, s mind a főgyökereken mind pedig a mellékgyökereken egyaránt előfordulnak. Az R_{B_9} -es törzs nagy vörös lebenyes gumókat képzett amelyek a főgyökéren és az azt körülvevő oldalgyökereken helyezkedtek el.

A tenyészcedény kísérletek során a törzseknek a gumóképzésre gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Meghatároztuk a különböző törzsekkel oltott növények össznitrogén tartalmát, valamint az egyes kezelésekhez tartozó növényegyedek növekedési intenzitását.

Az 1. táblázat adataiból látható hogy steril homokkultúrában a törzsek közül a gumóképzés szempontjából az R_{B_9} -es és az R_{B_4} -es törzsek voltak a legaktívabbak. A nagyméretű gumók száma alapján a sorrend a következőképpen alakult: $R_{B_9} = 58$, $R_{B_4} = 56$, R_{B_7} -es = 48 és végül az R_{B_6} -os törzsnél 27 gumó növényenkénti átlagban. Az össz gumószám tekintetében az R_{B_4} -es törzs került az első helyre, amelyet az R_{B_9} -es törzs követett. A másik két törzs mind az összes gumószám, mind pedig a nagyméretű gumók számának tekintetében viszonylag alacsony értéket képviselt. A nem sterilizált homokkal folytatott tenyészcedénykísérletnél a nagy gumók képzése szempontjából a sorrend az alábbiak szerint alakult: $R_{B_4} = 43$, $R_{B_6} = 38$, $R_{A_7} = 44$ és R_{B_9} -es törzs 48 gumó növényenként. Összes gumószám tekintetében az R_{B_6} -os törzs került az első helyre.

1. táblázat

Különböző Rh. phaseoli törzsekkel történő oltás hatásosságának vizsgálata a babgyökérgumók száma és nagysága alapján
(A gumók száma növényenként)

(1) Torzs	(2) Steril			(3) Nem steril			(4) Steril			(5) Nem steril		
	homok						talaj					
	nagy	kicsi	összes	nagy	kicsi	összes	nagy	kicsi	összes	nagy	kicsi	összes
Kontroll	—	—	—	8	15	23	—	—	—	10	19	29
R _{B4}	56	39	95	43	62	105	59	43	102	43	79	122
R _{B6}	27	47	74	38	106	144	27	130	157	47	27	74
R _{B7}	48	25	73	44	86	130	49	68	117	42	40	82
R _{B9}	58	34	92	48	55	103	64	22	88	51	36	87

A 2. és 3. táblázatok adatai azt mutatják, hogy a kísérletbe bevont törzsek lényegesen különböznek egymástól a növények magasságára, valamint a szár, gyökér és a gumók növényenkénti nyers és szárazsúlyára kifejezett hatásuk tekintetében is. Az R_{B_9} jelzésű törzsszel történő oltás eredményeképpen kaptuk a legnagyobb szárazanyag súlyt edényenként. Ez azt is demonstrálja, hogy a nagy gumók sűrű előfordulása megbízhatóbb kritériuma a törzs hatékonyságának.

2. táblázat

Rh. phaseoli különböző törzseivel oltott bab növények szárazsúlya
(g/edény)

(1) Törzs	(2) Steril			(3) Nem steril			(4) Steril			(5) steril		
	homok						talaj					
	szár	gyökér	össz- szes	szár	gyö- kér	össz- szes	szár	gyökér	összes	szár	gyökér	összes
Kontroll	5,64	1,32	6,96	6,27	1,43	7,70	7,58	1,54	9,12	6,58	2,16	8,74
R _{B4}	7,68	1,57	9,25	7,33	1,54	8,87	9,23	2,21	11,54	7,87	1,52	9,39
R _{B6}	6,27	1,87	8,14	7,03	1,68	8,71	8,25	1,80	10,05	8,82	2,30	11,12
R _{B7}	7,69	1,51	9,20	7,40	1,49	8,89	10,09	1,28	11,37	7,41	1,85	9,26
R _{B9}	7,81	1,61	9,42	8,20	1,46	9,66	9,38	2,32	11,70	9,31	1,94	11,25

3. táblázat

A Rh. phaseoli különböző törzseivel oltott magokból fejlődő bab növény magassága,
a gyökérgumóinak nyers- és szárazsúlya

(1) Törzs	(2) Steril			(3) Nem steril			(4) Steril			(5) Nem steril		
	homok						talaj					
	(6) Növé- nyek magas- sága cm	(7) Gumók		(6) Növé- nyek magas- sága cm	(7) Gumók		(6) Növé- nyek magas- sága cm	(7) Gumók		(6) Növé- nyek magas- sága cm	(7) Gumók	
		nyers	száraz		nyers	száraz		nyers	száraz		nyers	száraz
súlya mg		súlya mg			súlya mg			súlya mg				
Kontroll	37	—	—	37	220	33	35	—	—	38	270	41
R _{B4}	42	1770	294	45	1720	272	41	1830	327	42	1740	316
R _{B6}	40	830	128	40	1060	218	39	1150	171	41	1610	250
R _{B7}	41	1340	161	44	1760	261	46	1450	200	43	1500	167
R _{B9}	41	1840	303	43	1880	283	44	1860	332	42	1620	266

* a nyers gumók súlya/edény (4 növény volt minden edényben)

A 4. táblázatban mutatjuk be a növények edényenkénti össznitrogén tartalmát, valamint a megkötött nitrogén mennyiségét, amely korrelációban van a nagyméretű gumók számával, és a növény növekedésével. A növények összes nitrogéntartalma valamint a megkötött légköri nitrogén edényenkénti megoszlása szempontjából az R_{B4}-es törzs áll az első helyen, s utána az R_{B9}-es törzs következik.

Valamennyi fenti adat azt bizonyítja, hogy az R_{B9}-es törzs kötött meg legtöbb nitrogént. A törzsek teljesítőképességének kritériumaként a gumóknak a gyökérrendszerben való elhelyezkedését vehetjük. A leghatékonyabb törzsek a főgyökéren és a szomszédos másodlagos gyökereken képeztek gumókat. Ezek a gumók nagyok, lebeny-szerűek voltak és belsejük vörös színű volt. A nagy gumók mennyisége sokkal jobban kifejezi a törzsek teljesítőképességét mint az össz gumómennyiség. Ezt támasztja alá a növényeknek és a gumóknak a szárazanyagsúlya, valamint össznitrogén tartalma is.

4. táblázat

A Rh. phaseoli különböző törzseivel oltott magvakból fejlődött bab növényekben megkötött nitrogén mennyisége

(1) Törzsek	(2) Sterilizált					(3) Nem sterilizált				
	homok									
	(6) a növények N tartalma				(7) Törzsek által meg- kötött N	(6) a növények N tartalma				(7) Törzsek által meg- kötött N
	szár	gyökér	gumó	összesen		szár	gyökér	gumó	összesen	
mg/edény										
Kontroll	92,6	12,2	—	104,8	—	120,0	10,9	1,0	131,9	—
R _{B4}	373,8	49,8	14,9	437,7	332,9	339,5	46,6	13,0	399,1	267,2
R _{B6}	129,5	34,6	5,2	169,3	64,5	170,6	28,0	9,2	207,8	75,9
R _{B7}	247,7	39,9	7,5	295,1	190,3	289,9	42,3	11,9	344,1	212,2
R _{B9}	376,4	47,8	15,9	440,1	335,3	401,0	41,8	13,2	456,0	324,1

(1) Törzsek	(4) Sterilizált				(5) Nem sterilizált					
	talaj									
	(6) a növények N tartalma				(7) Törzsek által meg- kötött N	(6) a növények N tartalma				(7) Törzsek által meg- kötött N
	szár	gyökér	gumó	összesen		szár	gyökér	gumó	összesen	
mg/edény										
Kontroll	134,2	13,0	—	147,2	—	121,2	19,9	1,3	142,4	—
R _{B4}	354,4	62,6	15,7	432,7	285,5	290,8	46,6	14,3	351,7	209,3
R _{B6}	187,2	40,1	6,3	233,6	86,4	298,4	49,7	6,5	354,6	212,2
R _{B7}	367,4	31,2	8,7	407,3	260,1	275,6	50,8	6,1	332,5	190,1
R _{B9}	417,7	65,7	15,8	499,2	352,0	412,4	51,9	12,1	476,4	334,0

Eredmények megvitatása

Munkánk konklúziójaként megállapítható, hogy a bab növény az egyes egyiptomi talajokban minden valószínűség szerint azért nem képez gyökérgumókat, mivel effektív rhizobium törzsek nem fordulnak elő megfelelő mennyiségben ezekben a talajokban. Ezen adatainkat támasztják alá EL-FADL és munkatársai [12], valamint HARTY és BYGOTT [17] vizsgálatai is. Az effektív gumóképzés elmaradása magyarázható a talajba vitt rhizobiumok gyors pusztulásával is, ami azonban további vizsgálatokat igényel.

Vizsgálatainkból az is kitűnik, hogy az effektív gumóképzés limitáló faktorai nem a talajok viszonyai között keresendők mivel a növény effektív törzsszel történő oltás hatására nem steril talajban és homokban jelentős számban képez gumókat.

Kísérleteink során kitenyésztett 4 rhizobium törzs különbözött egymástól hatékonyságuk szempontjából. Az egyes fajok különböző törzseinek eltérő hatékonyságáról számolnak be ERDMAN és LEWIS [13], BALDWIN és FRED

[7], LÖHNIS [21], KROULIKE és GATNEY [19], VIRTANEN [27], ALLEN és ALLEN [4, 5] WAKSMAN [30], ALEXANDER [3] ABEL és ERDMAN [2] valamint TAHA és munkatársai [24] is.

A négy izolált törzs közötti különbség megmutatkozott az általuk képzett gumók méreteiben, belső színében és a gyökérrendszeren való elhelyezkedésükben is. Az R_{B_9} -es jelzésű legjobb teljesítőképességű törzs nagy számban képzett nagyalakú gumókat, amelyek a főgyökéren és a szomszédos másodlagos gyökereken helyezkedtek el. Ez a megfigyelés arra mutat rá, hogy a gumók alakja, mérete, belső színe és elhelyezkedése igen fontos az oltóanyag céljára szolgáló rhizobium törzsek kitenyésztése szempontjából. Ebből a célból a főgyökéren képződött nagyalakú magas leghemoglobin tartalmú gumókat kell kiválasztani. Több szerző ALLEN és ALLEN [4, 5], WAKSMAN [30], ALEXANDER [3], SALEM [23] eredményeinkhez hasonlóan ugyancsak azt állapította meg, hogy a nagy teljesítőképességű rhizobiumokat tartalmazó gumók számos hüvelyes növény gyökéren nyálábokban helyezkednek el a főgyökér felső részén és az elsődleges oldalgyökereken. Az ineffektív baktériumokat tartalmazó gumók ugyanazon növényen sokkal kisebbek, színük fehér, egyedülállóak és szétszórtnak helyezkednek el a gyökérrendszer legkülönbözőbb részein.

Ami a gyökérgumók színe és a bennük élő baktériumok teljesítőképessége közötti összefüggést illeti, véleményünk szerint ez a törzsek effektivitásának legfőbb kritériuma. Ezt támasztják alá VIRTANEN [26, 28] ALLEN és ALLEN [4] valamint ALEXANDER [3] adatai is, akik kimutatták, hogy a leghemoglobin az effektív gumókban minden esetben előfordul.

Amint az 1. táblázatból látható az R_{B_6} -os törzs nem steril talajban nagyobb számban váltott ki gumóképzést mint steril körülmények között. Véleményünk szerint ezt a serkentést a talajmikroflóra váltja ki, azonban ennek megismerése még a jövő feladatát képezi. A talaj különböző mikro-szervezetei talán a szerves foszforvegyületek átalakításával járulnak hozzá a szimbiotikus nitrogénkötéshez. ALEXANDER [3] ugyancsak arra mutat rá, hogy a talaj mikroszervezetei befolyásolhatják a rhizobiumok aktivitását. Egyes olyan törzsek ugyanis, amelyek steril talajban inaktívak, nem steril körülmények között effektív nitrogéntakótkké váhatnak.

Megállapítottuk, hogy a bab gyökérgumóinak összmennyisége nem vehető az effektivitás mutatójaként, mivel az össz gumószám és a megkötött nitrogén mennyisége között nincs szignifikáns korreláció. Viszont ilyen összefüggés kimutatható a nagyméretű, vörös pigmentanyagot tartalmazó gumók mennyisége és a növények nitrogéntartalma között (1. és 4. táblázatok.) Hasonló megállapításokról LÖHNIS [21], LEONARD [20], KROULIKE és GATNEY [19] WAKSMAN [30] FEDOROV [14], ALEXANDER [3], valamint SALEM [23] is közölnek adatokat. Az R_{B_9} -es törzsszel oltott növények mind tömegükben, mind pedig össznitrogéntartalmukat tekintve kiemelkedtek a többi közül. Ez azt demonstrálja, hogy a nagy szárazanyagsúly és a növény össznitrogénjének mennyisége legjobb indikátora a törzs teljesítőképességének.

Összefoglalás

Egyiptom különböző területein termesztett bab növény (*Phaseolus vulgaris*) gyökerein nem képződtek effektív gumók még olyan esetben sem, ha azokat specifikus *Rhizobium phaseoli* törzsszel oltották be. Az oltás siker-

telsége okainak tanulmányozása céljából számos helyi törzset teszteltünk, amelyeknél a teljesítőképesség és a képződött gyökérgumók sajátosságai közötti összefüggéseket vizsgáltuk.

A kapott adatok kizárták annak a valószínűségét, hogy az oltás eredménytelenségét a bakteriofágok, és a talaj, illetve rhizoszféra mikroszervezetek károsító hatása vagy a maghéj toxikus anyagai okozzák. Az általunk kitenyésztett 4 *Rhizobium phaseoli* törzs teljesítőképessége szempontjából lényegesen különbözött egymástól. Legjobb eredményt az R_{B5}-es törzsszel kaptuk, melyet a főgyökéren levő nagyméretű gumóból tenyésztettünk ki. A gumó belseje a leghemoglobin tartalom következtében rózsaszínű volt. Az egyes törzsek teljesítőképességét a gumók alakja, mérete, színe valamint a gyökérrendszeren való elhelyezkedésük alapján állapítottuk meg. Az összegumószám és a megkötött nitrogén mennyisége között nem volt szignifikáns korreláció ezért az előbbi nem lehetett az effektivitás mértékeként tekinteni. Viszont ilyen összefüggés kimutatható volt a nagyméretű vörös pigmentanyagot tartalmazó gumók mennyisége és a növények nitrogéntartalma között.

Irodalom

- [1] ABD-EL-GHAFFAR, A. S. & ALLEN, O. N.: The effects of certain microorganisms on the growth and function of rhizobia. Fourth Intern. Soil Sci. Congress, Amsterdam, Trans. **3**. 93–96. 1950.
- [2] ABEL G. H. & ERDMAN, L. W.: Response of Lee soybean to different strains of *Rhizobium japonicum*. Agron. J. **56**. 423–424. 1964.
- [3] ALEXANDER, M.: Introduction to soil microbiology. Wiley. New York–London. 1961.
- [4] ALLEN, E. K. & ALLEN, O. N.: Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. Bact. Rev. **14**. 273–330. 1950.
- [5] ALLEN, E. K. & ALLEN, O. N.: Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. Encyclopedia of Plant Physiology. **8**. 48. Springer. Berlin 1958.
- [6] ALLEN, O. N.: Experiments on soil microbiology. Burgess. Minnesota. 1961.
- [7] BALDWIN, I. L. & FRED, E. B.: Strain variation in the root nodule bacteria of clover *R. trifolii*. J. Bact. **17**. 141–150. 1929.
- [8] BURTON, J. C., ALLEN, O. N. & BERGER, K. C.: The prevalence of strains of *R. phaseoli* in some Mid-Western soils. Proc. Soil Sci. Soc. Amer. **16**. 167. 1952.
- [9] CASAS-CAMPILLO, C.: Importancia de los virus bacterianos (bacteriophagos) en la agricultura. Fitofilo **4**. 3–22. 1949. c.f. Allen & Allen, Bact. Rev. **14**. 273. 1949.
- [10] CUNNINGHAM, A.: The cultivation of lucerne. Scot. J. Agric. **11**. 42. 1928.
- [11] EL-FADL, M. A., EL-SHERBENI, M. F. & FAHMY, M.: An analysis of some factors affecting root nodule formation on garden bean in Egypt. Agric. Res. Rev. Egypt. **27**. 269–272. 1959.
- [12] EL-FADL, M. A., et al.: An analysis of some factors affecting root nodule formation on garden bean in Egypt. Agric. Res. Rev. Egypt. **41**. (a) 37–58. 1963.
- [13] ERDMAN, L. W. & LEWIS, W.: Studies on inoculated soybean: I. The importance of determining the number and size of soybean nodules for evaluating relative efficiencies of two or more cultures. J. Amer. Soc. Agron. **18**. 799. 1926.
- [14] FEDOROV, M. V. & LÁSZLÓ, G.: Azotfikszirujucsaja aktivnoszt' klubenkoviü bakterij goroha i viki v klubenkah v raznue razü razvitiya bobovogo raszteniya. Izv. TSzHA. (2) 61–82. 1956.
- [15] FEDOROV, M. V. & NITA, L.: Fiziologicseszkie razlicsia mezsdu stammami klubenkoviü bakterij goroha, i viki oldadajucsimi raznoj azotofixirujuscsej aktivnosztju. Mikrobiologija. **30**. 3. 1961.
- [16] FRED, E. B., BALDWIN, I. L. & MCCOY, E.: Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. of Wisconsin Studies in Science. **5**. 543. 1932.
- [17] HARTY, R. L. & FYGOTT, R. B.: Studies on the growth of soybeans on the Darling Downs, Queensland. Qd. J. Agric. Sci. **21**. 205–212. 1964.
- [18] KAMATA, E.: Morphological and physiological studies on nodule formation in leguminous crops. 7. Variation in the nodule formation capacity in strains of *R. ja-*

- ponicum. S. The nitrogen fixing systems in nodules of pea plants. Proc. Crop Sci. Soc. Japan. **31**. 78—82. 1962.
- [19] KROULKA, J. T. & GATNEY, P. L.: Physiological studies of *R. meliloti* with special references to the effectiveness of strains isolated in Kansas. Ref. Soils & Fert. **5**. 315. 1942.
- [20] LEONARD, L. T.: A failure of Australian winter peas apparently due to nodule bacteria. J. Amer. Soc. Agron. **22**. 277—279. 1930.
- [21] LÖHNIS, M. P.: Investigation upon the effectiveness of root nodules of leguminosae. Zbl. Bact. II. Abt. **80**. 342—368. 1930.
- [22] NILSON, P. E.: The influence of antibiotics and antagonists on symbiotic nitrogen fixing in legume cultures. Ann. Roy. Agric. Coll. Sweden. **23**. 219—253. 1957.
- [23] SALEM, S. H.: Studies on nodule bacteria in Egypt. M. Sc. Thesis. College of Agric. Ain Shams Univ. Cairo. 1963.
- [24] TAHA, S. M., MAHMOUD, S. A. Z. & SALEM, S. H.: Efficiency of root nodule bacteria. V. Arabic Scientific Conference Book. Baghdad. (in Arabic) 503. 1966.
- [25] THORNTON, H. G.: The "Inoculation", of Lucerne (*Med. sativa*) in Great Britain. J. Agric. Sci. (England). **19**. 48. 1929.
- [26] VIRTANEN, A. I.: Some additional notes to the studies on leghaemoglobin. Suomen Kemis. **19**. 48. 1946.
- [27] VIRTANEN, A. I.: The biology and chemistry of nitrogen fixation by legume bacteria. Biol. Rev. **22**. 239—269. 1947.
- [28] VIRTANEN, A. I.: Some problems concerning the legume bacteria and the nitrogen fixation. Fourth Intern. Cong. Microbiol. Copenhagen Rept. Proc. 476—477. 1949.
- [29] VIRTANEN, A. I. & LINKOLA, H.: On the antibacterial effect of spore-forming soil bacteria on the legume bacteria. Suomen Kemis. **21**. 12—13. 1948.
- [30] WAKSMAN, S. A.: Soil Microbiology. Wiley. New York. 1952.
- [31] WILSON, J. K.: The effect on nodulation of supplementing the legume bacteria of the soil with artificial cultures. J. Amer. Soc. Agron. **7**. 139. 1926.

Érkezett: 1970. augusztus 28.

Methods of Isolation of Effective Strains of *Rhizobium phaseoli*

S. A. Z. MAHMOUD, S. M. TAHA, and S. H. SALEM

Dept. Agric. Microbiology, College of Agric., Ain Shamo University, Cairo, U. A. R.

Summary

It was found that the beans (*Phaseolus vulgaris*) cultivated in different localities in Egypt failed to form effective nodules, even after inoculation with their specific strain of *Rhizobium phaseoli*. Therefore, in order to study the reasons of the failure several local strains were tested to examine their efficiency and its relation to the characteristics of the nodules formed.

The data obtained excluded the probability of the harmful influence of bacteriophages or microorganisms of the soil and of the rhizosphere or toxic substances present in the outer coat of the seeds on the success of inoculation. The effectiveness of the four isolated *Rhizobium phaseoli* strains significantly differed from each other. The best results were obtained with R_{B9} which was isolated from lobed nodules present on the main root. The internal part of the nodule was pink attributed to leghaemoglobin. The efficiency of the different strains was established on the basis of the shape, colour, size of the formed nodules and on their location on the root system. Total numbers of nodules could not be taken as an index of effectiveness since there was no significant correlation between the total number of nodules and the amount of fixed N. Such correlation could be demonstrated between the quantity of big, red pigment containing nodules and the N content of the plants.

Table 1. Examination of the effectivity of inoculation with different Rh. phaseoli strains on the basis of the size and number of nodules (number of nodules per plant). (1) Strain. (2) In sterilized sand big, small, total. (3) In unsterilized sand, big, small and total. (4) In sterilized soil, big small, total. (5) In unsterilized soil, big, small, total.

Table 2. Dry weight of bean plants inoculated with different strains of *Rhizobium phaseoli*, (g/pot). (1) Strain. (2) Shoots, root, total in sterilized sand. (3) Shoots, root, total in unsterilized sand. (4) Shoots, roots, total in sterilized soil. (5) Shoots, root, total in unsterilized soil.

Table 3. Height of plant, fresh and dry weight of nodules of bean inoculated with different strains of *Rhizobium phaseoli*. (1) Strain. (2) Sterilized sand. (3) Unsterilized sand. (4) Sterilized soil. (5) Unsterilized soil. (6) Height of plants, cm. (7) Fresh and dry weight of nodules, mg. Weight of fresh nodules/pot (every pot contained 4 plants).

Table 4. Nitrogen fixed in bean developed from seeds inoculated with different strains of *Rhizobium phaseoli*. (1) Strains. (2) Sterilized sand. (3) Unsterilized sand. (4) Sterilized soil. (5) Unsterilized soil. (6) N content of plants in shoots, root, nodule and total. (7) N fixed by the strains, mg/pot.

Méthodes pour isoler des souches de *Rhizobium phaseoli* à grande effectivité

S. A. Z. MAHMOUD, S. M. TAHA et S. H. SALEM

Chaire de Microbiologie Agricole, Faculté d'Agronomie, Ain Shams Université, Le Caire, RAU

Résumé

Sur les racines des plantes de haricots (*Phaseolus vulgaris*) cultivées sur différents territoires d'Égypte, on ne pouvait pas trouver de nodules effectifs même après l'inoculation avec des souches spécifiques de *Rh. phaseoli*. Pour étudier les causes d'insuccès de l'inoculation, nous avons testé plusieurs souches locales concernant la corrélation entre leurs effectivités et les caractéristiques des nodosités formées.

Les données obtenues excluent la probabilité que l'ineffectivité de l'inoculation puisse être attribuée à l'influence désavantageuse des bactériophages ou des microorganismes du sol et rhizosphériques ou à celle des matières toxiques du tégument. Les 4 souches de *Rh. phaseoli* isolées par nous diffèrent profondément en leurs efficacités. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la souche R_{B_9} , isolée d'un grand nodule se trouvant sur la racine principale. La partie intérieure du nodule était rosée par suite de la teneur en leghémoglobine. L'efficacité des souches respectives a été appréciée par la forme, la grandeur, la couleur des nodosités, ainsi que par leur disposition sur le système racinaire. Il n'y avait pas de corrélation significative entre le nombre total des nodosités et la quantité de l'azote fixé, conséquemment ce premier ne pouvait pas être regardé comme la mesure de l'effectivité. Cependant, on trouvait de tels rapports entre la quantité des grands nodules contenant de matière pigmentaire rouge et la teneur en azote des plantes.

Tableau 1. Examen de l'efficacité de l'inoculation avec de différentes souches de *Rh. phaseoli*, à partir du nombre et de la grandeur des nodules (Nombre des nodules par plante). (1) Souche. (2) Dans sable stérile: grands, petits, total. (3) Dans sable non stérile: grands, petits, total. (4) Dans sol stérile: grands, petits, total. (5) Dans sol non stérile: grands, petits, total.

Tableau 2. Poids sec des plantes de haricots après l'inoculation avec de différentes souches de *Rh. phaseoli* (g/vase). (1) Souche. (2) Dans sable stérile: tige, racine, total. (3) Dans sable non stérile: tige, racine, total. (4) Dans sol stérile: tige, racine, total. (5) Dans sol non stérile: tige, racine, total.

Tableau 3. Hauteur des plantes de haricots développées des graines inoculées avec de différentes souches de *Rh. phaseoli*; poids frais et sec des nodules. (1) Souche. (2) Sable stérile. (3) Sable non stérile. (4) Sol stérile. (5) Sol non stérile. (6) Hauteur des plantes, cm. (7) Poids frais et sec des nodules, mg. Poids des nodules secs/vase. (Chaque vase contenait 4 plantes).

Tableau 4. Teneur en azote fixé des plantes de haricots développées des graines inoculées avec de différentes souches de *Rh. phaseoli*. (1) Souches. (2) Sable stérilisé. (3) Sable non stérilisé. (4) Sol stérilisé. (5) Sol non stérilisé. (6) Teneur en N des plantes: dans la tige, la racine, les nodules et totale. (7) N fixé par les souches, mg/vase.

Методы выделения высокопродуктивных штаммов *Rhizobium phaseoli*

С. А. З. МАХМУД, С. М. ТАХА и С. Х. САЛЕМ

Кафедра Сельскохозяйственной Микробиологии Агрономического факультета Университета Ain Sham, в Каир, О. А. Р.

Резюме

На корнях бобового растения (*Phaseolus vulgaris*) произрастающего на различных территориях Египта, не образуются эффективные клубеньки, даже при заражении их специальными штаммами *Rhizobium phaseoli*. Для изучения причин безуспешного заражения выделялись местные штаммы, у которых изучались зависимости между их продуктивностью и характером образования корневых клубеньков.

Полученные данные исключают возможность того, что причина плохой прививаемости скрывается в неблагоприятном влиянии бактериофагов, почвенных и ризосферных микроорганизмов или токсических веществ, содержащихся в оболочке зерна. Выделенные четыре штамма *Rhizobium phaseoli* с точки зрения их продуктивности в значительной степени отличались друг от друга. Самые благоприятные результаты были получены со штаммом R_{B3}, который выделили из большого клубенька, находящегося на главном корне. Внутренняя часть клубенька из-за содержания лег-гемоглобина была розового цвета. Продуктивность отдельных штаммов определялась по форме клубеньков, по их размеру, цвету и по расположению на корневой системе растения. Не наблюдалось достоверной зависимости между общим количеством клубеньков и количеством связанного азота, поэтому первое нельзя принимать за величину характеризующую эффективность. Наблюдалась зависимость между количеством большого размера клубеньков, содержащих красное пигментное вещество и содержанием азота в растении.

Табл. 1. Изучения эффективности заражения различными штаммами *Rhizobium phaseoli* по количеству и размеру клубеньков, образованных на корнях бобовых растений. (Количество клубеньков, приходящееся на одно растение.) (1) Штамм. (2) На стерильном песке клубеньки большие, маленькие и всего. (3) На нестерильном песке клубеньки большие, маленькие и всего. (4) На стерильной почве клубеньки большие, маленькие и всего. (5) На нестерильной почве клубеньки большие, маленькие и всего.

Табл. 2. Сухой вес бобовых растений в г/сосуд привитых различными штаммами *Rhizobium phaseoli* (1) Штамм. (2) На стерильном песке — стебель, корень, все растение. (3) На нестерильном песке — стебель, корень, все растение. (4) На стерильной почве — стебель, корень, все растение. (5) На нестерильной почве-стебель, корень, все растение.

Табл. 3. Высота бобового растения, развившегося из семян обработанных различными штаммами *Rhizobium phaseoli* а также вес свежих и высушенных корневых клубеньков. (1) Штамм. (2) Стерильный песок. (3) Нестерильный песок. (4) Стерильная почва. (5) Нестерильная почва. (6) Высота растений в см. (7) Сырой и сухой вес клубеньков, мг. Вес свежих клубеньков/сосуд. (по четыре растения в каждом сосуде).

Табл. 4. Содержание связанного азота в бобовых растениях, развившихся из семян обработанных различными штаммами *Rhizobium phaseoli* (1) Штамм. (2) Стерильный песок. (3) Нестерильный песок. (4) Стерильная почва. (5) Нестерильная почва. (6) Содержание азота в растении, в стеблях, корнях, клубеньках и всего. (7) Количество азота связанного штаммами в мг/сосуд.